

Einfluß der Reagenzien auf die Meßwerte bei LDH- und Transaminasen-Bestimmungen

Von A. HÄRTEL, R. HELGER, H. LANG

Aus der Biochemischen Abteilung der E. Merck AG, Darmstadt

(Eingegangen am 3. Februar 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Der Einfluß der Reagenzienqualität auf die Meßergebnisse der LDH¹⁾- und Transaminasen-Bestimmung wird untersucht. Systematische Abweichungen werden bei der LDH am häufigsten durch Hemmstoffe im NADH₂, bei den Transaminasen vor allem durch die Anwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen verursacht.

Die Angaben verschiedener Autoren über die Normalwerte der LDH und Transaminasen werden zusammengestellt. Es ergibt sich eine breite Streuung der Daten. Um den Einfluß der systematischen Fehler zu verringern, wird empfohlen, weniger störanfällige optimierte Methoden zur Bestimmung zu verwenden.

The influence of the quality of reagents on the determination of LDH¹⁾ and transaminases was investigated. Systematic variations in the measurement of LDH were most frequently caused by inhibitors in the NADH₂, while variations in the measured transaminase activity were caused by the use of different substrate concentrations.

The data of various authors on the normal activities of LDH and transaminases show a wide variation. To decrease the systematic error, optimized methods, which are less susceptible to interference, are recommended.

In der medizinischen Literatur stimmen die Normalbereiche, die von den einzelnen Arbeitskreisen für die Serumbestandteile mitgeteilt werden, häufig nicht überein. Diese Tatsache läßt sich in vielen Fällen dadurch erklären, daß verschiedene Analysemethoden verwendet werden, die unterschiedliche Spezifitäten und Fehlerbreiten besitzen. Aber selbst wenn alle Untersucher die prinzipiell gleiche Methode benutzt haben, differieren die Ergebnisse oft stark. Im allgemeinen werden hierfür geringe Abweichungen in der experimentellen Durchführung verantwortlich gemacht (ungenaueres Einhalten von Reaktionszeit und -temperatur, pH-Abweichungen, unterschiedliche Kollektive, schlechte Reproduzierbarkeit, mangelnde Qualitätskontrolle usw.). Die Unterschiede in den Normalbereichsangaben sind aber auch bei den sehr einfach durchführbaren und als gut reproduzierbar geltenden UV-Testen häufig so groß (s. Abb. 1—3), daß außer den genannten Einflüssen andere Fehlermöglichkeiten in Erwägung gezogen werden müssen.

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen der auf dem Markt befindlichen Reagenzien können einige dieser Fehlerquellen genauer definiert werden. Gerade bei den NADH₂-abhängigen Bestimmungen wird das Analyseergebnis stark durch die Reagenzienqualität beeinflusst. Die hierdurch bedingten Abweichungen sind häufig für alle Ansätze konstant, die mit den Reagenzien einer Charge durchgeführt werden, so daß das Erkennen des Fehlers im Routinelabor oft sehr schwierig oder unmöglich ist. Deshalb sollen einige wichtige durch das Reagenz bedingte Faktoren, die das Analyseergebnis und damit den Normalbereich beeinflussen, kurz diskutiert werden.

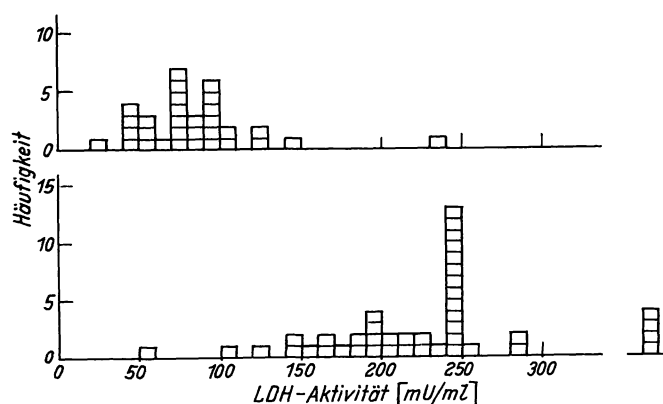


Abb. 1
Häufigkeitsverteilung der LDH-Normalbereichsangaben verschiedener Arbeitskreise
Oben: Untergrenze, Unten: Obergrenze

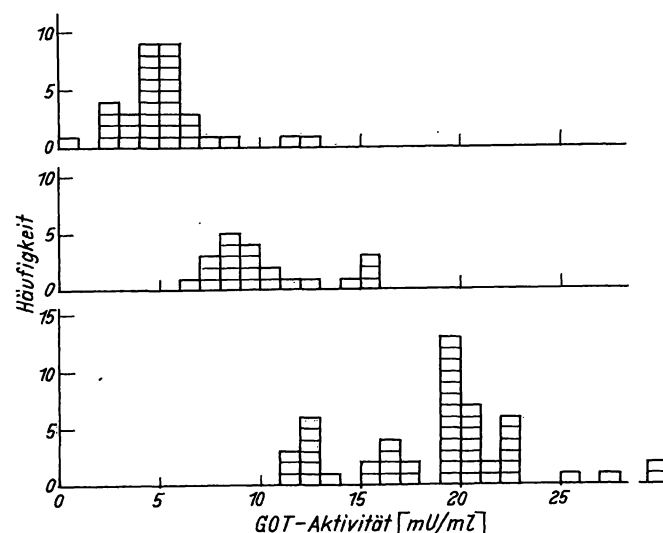


Abb. 2
Häufigkeitsverteilung der GOT-Normalbereichsangaben verschiedener Arbeitskreise. (Substratkonzentration nach KARMEN (11))
Oben: Untergrenze, Mitte: Mittelwerte, Unten: Obergrenze

¹⁾ Abkürzungen und Enzyme:

LDH: L-Lactat: NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.27),
MDH: L-Malat: NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.37),
GOT: L-Aspartat: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (EC 2.6.1.1),
GPT: L-Alanin: 2-Oxoglutarat-Aminotransferase (EC 2.6.1.1),
HBDH: 2-Hydroxybutyrat: NAD-Oxydoreduktase.

LDH-Bestimmung

Besonders auffällig weichen die Angaben über den LDH-Normalbereich voneinander ab, bei dessen Bestim-

mung es eigentlich aufgrund der einfachen Durchführung (2—3 Pipettierungen, kinetische Messung) überhaupt keine Schwierigkeiten geben sollte. Aber gerade hier wird mehrfach die Ansicht vertreten (1,2), daß in jedem Labor ein eigener Normalbereich bestimmt und verwendet werden sollte.

Die Ursache für die mangelnde Übereinstimmung liegt zum Teil in dem bekannten Einfluß von pH und Substratkonzentration auf die Meßergebnisse (3). Durch das Arbeiten nach Vorschriften mit unterschiedlichen Pyruvat-Konzentrationsangaben (2—4) oder durch Ungenauigkeiten im Pyruvatgehalt, die wegen der geringen Einwaage (0,1 bzw. 0,3 mg/3-m/-Ansatz) oder bei Verwendung von enzymatisch nicht voll aktivem Pyruvat verhältnismäßig leicht vorkommen, werden die Normalbereiche beeinflusst. Deshalb sollte mindestens bei der Festlegung des LDH-Gehaltes eines Serum-Pools, der für Standardzwecke verwendet wird, der Pyruvatgehalt nachträglich im Reagenz bestimmt werden, was verhältnismäßig einfach auf enzymatischem Weg durchgeführt werden kann (3).

Schwierig ist dagegen die Kontrolle des Coenzym (NADH₂), für das die üblichen Reinheitskriterien (3) nicht ausreichen. Wenn z. B. bei der Gefriertrocknung von NADH₂ spezielle Bedingungen nicht sehr genau eingehalten werden, bildet die Verbindung im festen Zustand später bei der Lagerung auch bei 4° Hemmstoffe, die bereits in sehr kleiner Konzentration zu geringe LDH-Werte vortäuschen. Dieser Fehler läßt sich durch eine NADH₂-Überdosierung nicht beheben, da hierdurch auch die Hemmstoffkonzentration vergrößert wird (s. Abb. 4). Auch bei der HBDH-Bestimmung verursachen diese Hemmstoffe Störungen, allerdings erst in größerer Konzentration.

Durch Extinktionsmessungen im UV-Bereich und durch die enzymatische Gehaltsbestimmung (3) können die Hemmstoffe nicht nachgewiesen werden. Bei großen Konzentrationen ist ein dünnschichtchromatographischer Nachweis möglich. Man erhält außer einer Reihe anderer Verunreinigungen 2—3 im UV-Licht schwach fluoreszierende Zonen, die geringere R_F -Werte als das NADH₂ besitzen. Nach dem Eluieren läßt sich nachweisen, daß nur diese Fraktionen die LDH-Bestimmung hemmen. Zur Herstellung von hemmstofffreien NADH₂-Standardlösungen ist die Dünnschichtchromatographie jedoch schlecht geeignet. Dagegen erhält man einwandfreie Standards auch aus stark verunreinigtem Material durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose bei 4° (modifiziert nach STRANDJORD u. CLAYSON (5) (s. Abb. 5). Hierdurch können auch die Hemmstoffe angereichert werden. Es handelt sich um Verbindungen mit NAD-ähnlichen UV-Spektren, die jedoch nicht mit dem des LDH-Inhibitors übereinstimmen, den STRANDJORD und CLAYSON durch längeres Lagern einer eingefrorenen NADH₂-Lösung erhalten haben (5).

Mit Hilfe des chromatographisch gereinigten NADH₂ als Standard ist die Bestimmung des Hemmstoffgehaltes im NADH₂ sehr einfach. Man vergleicht die LDH-Werte, die sich bei der Untersuchung eines Serums mit

verschiedenen NADH₂-Präparaten ergeben. Proben, die im Vergleich zum Standard einen um mehr als 5% zu tiefen Wert zeigen, sind für die LDH-Bestimmung un-

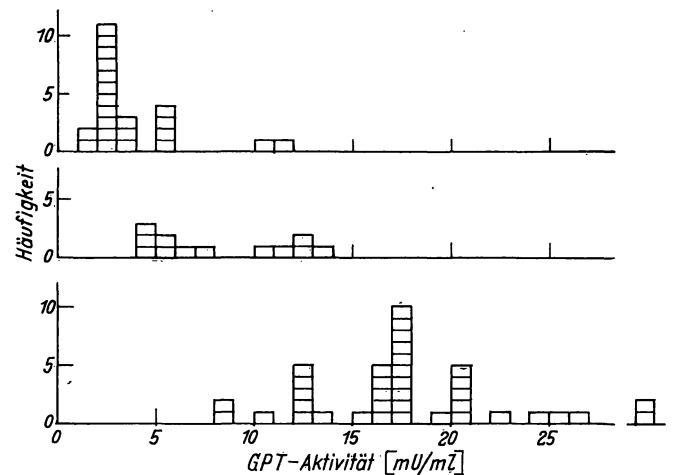


Abb. 3
Häufigkeitsverteilung der GPT-Normalbereichsangaben verschiedener Arbeitskreise. (Substratkonzentration nach KARMEN (11))
Oben: Untergrenze, Mitte: Mittelwerte, Unten: Obergrenze

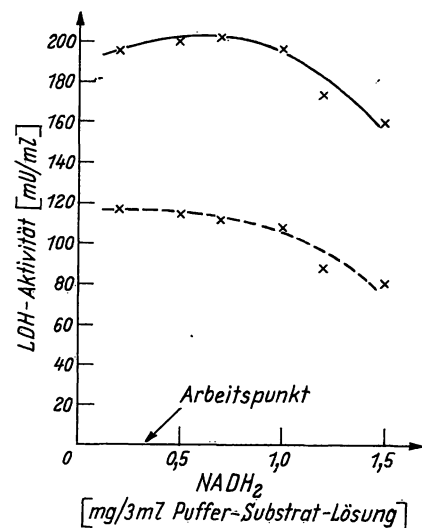


Abb. 4
Abhängigkeit der Meßergebnisse bei der LDH-Bestimmung von der NADH₂-Konzentration
x — x bei Verwendung von hemmstofffreiem NADH₂
x — x bei Verwendung von hemmstoffhaltigem NADH₂

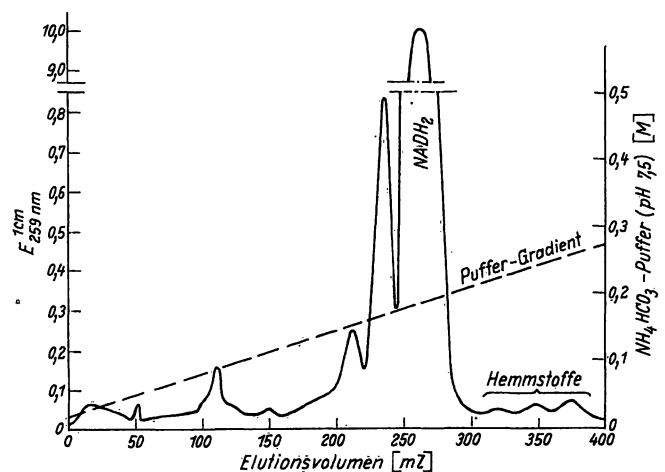


Abb. 5
Chromatographische Reinigung von hemmstoffhaltigem NADH₂

geeignet. Sehr gute NADH_2 -Präparate sind sogar bei Zimmertemperatur fast ein Jahr lang haltbar, während ungeeignete Präparate bereits bald nach der Herstellung auch bei 4° Hemmstoffe bilden.

Transaminasen-Bestimmung

Die Bestimmung der Transaminasen (UV-Methode) wird durch eventuell vorhandene LDH-Hemmstoffe nicht beeinflusst, da wegen des verwendeten Überschusses an Hilfsenzymen die Umsetzung des Pyruvats bzw. Oxalacetats mit NADH_2 nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Diese Bestimmungen sind im Gegensatz zu den entsprechenden kolorimetrischen Farbtesten mit Dinitrophenylhydrazin gut reproduzierbar. Es kommt jedoch zu systematischen reagenzbedingten Abweichungen. Handelsübliche MDH-Präparate, die für die GOT-Bestimmung verwendet werden, besitzen zwar keine direkt meßbare GOT-Aktivität. Wie aber schon mehrfach berichtet (6, 7), kann man in vielen Präparaten Apo-GOT-Verunreinigungen messen, die bei der Vorinkubation des Ansatzes durch Pyridoxalphosphat des Serums aktiviert werden und zu hohe Werte vortäuschen können. Diese Störung macht sich bei Analysen ohne zusätzlichen Pyridoxalphosphatzusatz und ohne bzw. bei nur kurzer Vorinkubation kaum bemerkbar. Dagegen erhält man um bis zu 20 mU/ml zu hohe Werte, wenn man die seit einigen Jahren diskutierte Pyridoxalphosphat-Aktivierung (6, 8–10) anwendet. Eine weitere Komplikation bei der Bestimmung der Transaminasen wird dadurch hervorgerufen, daß man bis vor kurzer Zeit fast ausschließlich nach den Methoden von KARMEN (11) gearbeitet hat, bei denen nicht optimale Substratkonzentrationen angewendet werden. Diese Arbeitsweise steht nicht nur im Widerspruch zu den Empfehlungen der IUB (12) sondern bedingt auch eine geringere Empfindlichkeit der Methoden. Außerdem machen sich Fehler in der Substratkonzentration relativ stark bemerkbar, da im Gegensatz zu den optimierten Verfahren in Konzentrationsbereichen starker Substratabhängigkeit gearbeitet wird (3).

Normalbereichsangaben verschiedener Arbeitskreise

Wir haben in den letzten Jahren alle uns zugänglichen Normalbereichsangaben gesammelt und überblicken heute für die LDH und für die Transaminasen jeweils rund 50 Angaben, die mit den konventionellen Methoden unter weitgehend übereinstimmenden Versuchsbedingungen erhalten wurden (13). Diese Daten stammen aus der Literatur, aus befreundeten Kliniklaboratorien und aus eigenen Messungen. Interessant ist an dieser Zusammenstellung nicht die große Zahl der zugrunde liegenden Einzelmessungen (größenordnungsmäßig 10000), sondern die Tatsache, daß die Messungen voneinander unabhängig in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurden. Es ergibt sich eine breite Streuung der Angaben für die Untergrenzen, die

Mittelwerte und die Obergrenzen der Normalbereiche (s. Abb. 1–3).

Man erhält prinzipiell gleiche Häufigkeitsverteilungen, wenn man die Daten z. B. nach Veröffentlichungsjahren oder nach den Angaben über verwendete Reagenzien aufschlüsselt. Die mangelnde Übereinstimmung kann durch reagenzbedingte systematische Fehler, durch unterschiedliche Kollektive und durch die spezielle Fragestellung bei der Transaminasen-Bestimmung (z. B. Diagnose „sicher gesund“ bei Blutspendern oder „krank“ bei Patienten) verursacht sein. Es ist anzunehmen, daß die breite Streuung der Daten durch Summierung aller Faktoren zustande kommt. Durch Optimierung der Methoden und Kontrolle der Reagenzien können die systematischen Fehler und damit ein Teil der Faktoren, die zu den Unterschieden bei Angabe der Transaminasen-Normalwerte führen, weitgehend ausgeschaltet werden.

Beschreibung der Versuche

Dünnschichtbromatographischer Nachweis von größeren Hemmstoffkonzentrationen im NADH_2 (> 20 % Hemmwirkung)

Man löst 10 mg des zu untersuchenden NADH_2 in 0,1 ml Wasser und trägt die Lösung strichförmig ($\sim 3 \mu\text{l}/\text{cm}$) auf eine mit PEI-Cellulose (Merck Nr. 2336) beschichtete Dünnschichtplatte auf. Anschließend entwickelt man die Platte mit 0,2 M Trispuffer, pH = 9,0, Dauer 40 Min. Nach dem Trocknen erkennt man unter der UV-Lampe folgende bei 254 nm absorbierende Zonen: $R_F = 0,66$, $R_F = 0,49$, $R_F = 0,43$ (NADH_2) und folgende bei 366 nm fluoreszierende Zonen $R_F = 0,43$ (NADH_2), $R_F = 0,2$ (sehr schwach fluoreszierend) $R_F = 0,14$ (sehr schwach fluoreszierend). Man schabt diese Zonen von der Platte, gibt 0,3 M NH_4HCO_3 -Puffer (pH = 7,5) hinzu, zentrifugiert und prüft die Hemmwirkung im LDH-Test. Die beiden zuletzt genannten Zonen besitzen im Gegensatz zu den anderen eine starke Hemmwirkung.

Herstellung einer hemmstofffreien NADH_2 -Lösung aus verunreinigtem Material

25 g DEAE-Cellulose (Serva Type DEAE SS) werden in 1 / 0,5 N HCl aufgeschlämmt, nach 30 Min. auf der Nutsche abgesaugt und mit Wasser gewaschen, bis pH 4 erreicht ist. Dann schlämmt man den Brei in 1 / 0,5 N Natronlauge auf, saugt nach 30 Min. ab und wäscht mit Wasser bis zum pH = 8. Anschließend schlämmt man den Brei in einem Meßzylinder in 2 l Wasser auf und dekantiert die feinen Cellulosepartikel, die später die Säule verstopfen würden. Man wiederholt diesen Vorgang noch einige Male mit Wasser und zuletzt mit 0,02 M NH_4HCO_3 -Puffer. Man füllt den Cellulose-Brei in ein Chromatographierohr (8 mm Ø, 100 cm lang), läßt absitzen, temperiert die Säule auf $+4^\circ$ und trägt auf die jetzt 70 cm lange Säule eine Lösung von 15 mg NADH_2 in 0,5 ml Wasser auf. Die Säule wird luftblasenfrei mit den Gradientengefäßen, die mit je 200 ml 0,02 bzw. 0,3 M NH_4HCO_3 -Puffer gefüllt sind und die 2 m höher als das Säulenende gelagert werden, verbunden. Es wird mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/Std. eluiert und in 3,5 ml-Fractionen aufgefangen. Man mißt die Extinktionen bei 259 bzw. bei 340 nm und die Hemmwirkung im LDH-Test. Die NADH_2 -Fractionen, bei denen das Verhältnis der Extinktionen $E_{259}:E_{289}:E_{340} = 1:0,095:0,430$ beträgt, werden zum Gebrauch als Standard mit Wasser so weit verdünnt, daß die Extinktion bei 340 nm 3,0 beträgt (1 cm Schichtdicke).

Messung des Hemmstoffgehaltes verschiedener NADH_2 -Präparate

Der Inhalt einer Flasche (1) der Merckotestpackung LDH (Merck Nr. 3303) wird in 100 ml Wasser gelöst (0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,5; 1,2 mM Natriumpyruvat). Zu 30 ml dieser Lösung gibt man 2 ml frisches Humanserum und filtriert das Gemisch durch ein Papierfilter. Man pipettiert 1 ml dieser Lösung in ein Reagenz-

glas, gibt 1 ml/ hemmstofffreie NADH₂-Lösung bzw. die zu untersuchende NADH₂-Lösung (0,5 mg/ml) hinzu, mischt und gießt die Lösung sofort in eine Küvette des Photometers (25°, 366 oder 340 nm). Nach etwa 1 Min. mißt man die Extinktion und drückt gleichzeitig auf die Stoppuhr. Die Messung wird 5 Min. lang jede Minute wiederholt, wobei die Extinktionsdifferenzen pro Minute bei 340 nm kleiner als 0,1, die bei 366 nm kleiner als 0,5 sein sollen. (Sonst den Ansatz mit weniger Serum wiederholen!). Die bei Verwendung von Standard (S) bzw. zu untersuchender Lösung (A) gemessenen Extinktionsdifferenzen $\Delta E/5$ Min. werden in folgende Berechnungsformel eingesetzt:

$$\text{LDH-Hemmung} = \left(1 - \frac{\Delta E_5^A \text{ Min.}}{\Delta E_5^S \text{ Min.}} \right) 100 [\%]$$

Anreicherung der Hemmstoffe

Man führt die Chromatographie wie bei der Herstellung der hemmstofffreien NADH₂-Lösung durch, wobei jedoch folgende Änderungen erforderlich sind: Als Probe verwendet man 100 mg stark hemmstoffhaltiges NADH₂ in 1 ml/ Wasser. Man eluiert die Säule mit einem linearen Puffer-Gradienten von 0,1—0,3 M NH₄HCO₃. Sechzig 3-ml-Fraktionen, die nach dem NADH₂ kommen, werden

vereinigt. Man entfernt das Wasser durch Gefriertrocknung, rührt den Salzzückstand mit wenig Wasser an, kühlt auf 4° und saugt mit einer Kolbenpipette mit Filteraufsatz den Kristallbrei ab. Das Filtrat wird nochmals auf eine Chromatographiesäule aufgetragen und wie oben angegeben chromatographiert. Man erhält im Chromatogramm 3 gut getrennte Fraktionen ($E_{260\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1,5$ bzw. 1,0 bzw. 0,6, von denen zwei eine starke Hemmwirkung im LDH-Test zeigen. Die UV-Maxima dieser Fraktionen liegen bei 260 bzw. 272 nm.

Bestimmung des Apo-GOT-Gehaltes in GOT-Reagenzien

Man führt mit den zu prüfenden Reagenzien eine normale GOT-Bestimmung mit Vorinkubation durch, wobei jedoch an Stelle von Serum eine frisch hergestellte Lösung von 0,5 mg Pyridoxalphosphat (Merck Nr. 7526) in 10 ml/ 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,4 verwendet wird und wobei die Vorinkubationszeit auf 30 Min. verlängert wird. Nach dem Starten der Reaktion mit Ketoglutarat mißt man die Extinktionsabnahme/Zeit wie üblich und berechnet hieraus den durch Apo-GOT maximal vortäuschbaren GOT-Gehalt.

Wir danken Fräulein R. FINKENAUER und Frau A. HIMSEL für die Durchführung der Versuche.

Literatur

1. FORSTER, G., Schweiz. med. Wschr. 97, 329 (1967).
2. RICHTERICH, R., Klinische Chemie. S. 270. Akademische Verlagsges. Frankfurt a. M. (1965).
3. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, S. 737, 838, 846 u. 1012, Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße (1962).
4. SELIGSON, D., Standard Methods of Clinical Chemistry 4, 164, Academic Press, New York, London (1963).
5. STRANDJORD, P. E. und K. J. CLAYSON, J. Laborat. Clin. Med. (St. Louis) 67, 144 (1966).
6. STANULOVIC, M., D. MILETIC und A. STOCK, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 17, 353 (1967).
7. ZIMMERMANN, H. J., I. J. SILVERBERG und M. WEST, Clin. Chem. (New York) 6, 216 (1960).
8. AMELUNG, D., Fermentdiagnostik interner Erkrankungen, S. 124. Georg Thieme, Stuttgart (1964).
9. HAMFELD, A., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 18, Suppl. 92, 181 (1966).
10. HAMFELD, A., Clin. chim. Acta (Amsterdam) 16, 19 (1967).
11. KARMEN, A., J. Clin. Invest. 34, 131 (1955).
12. FLORKIN, M. und E. H. STOTZ, Comprehensive Biochemistry. Vol. 13. S. 6. Elsevier Publishing Company, London, New York (1964).
13. HÄRTEL, A., Unveröffentlichte Arbeit, E. Merck AG, Darmstadt (1967).

Dr. A. Härtel
E. Merck A.G.
Biochemische Abteilung
61 Darmstadt 2
Postfach 4119

Über die Wirkung ionisierender Strahlen auf den Mg-Stoffwechsel

Von TH. GÜNTHER und G. BUBLITZ

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Schütte) und der Strahlenabteilung des Städt. Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin-Schöneberg (Chefarzt: Prof. Dr. W. Frommhold)

(Eingegangen am 23. Januar 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

An männlichen Ratten wurde das Verhalten des Magnesiums nach einer einzeitigen ⁶⁰Co-Ganzkörperbestrahlung von 1000 R untersucht. 4 Tage nach Bestrahlung hatte der Mg-Gehalt im Serum und in der Leber zugenommen. Im Muskel kam es zu keiner wesentlichen Veränderung der Mg-Verteilung. Der Anstieg der Mg-Konzentration im Serum erfolgte vom 3. Tag nach der Bestrahlung an. Mit dieser Zunahme der Mg-Konzentration im Serum ging eine verminderte Mg-Ausscheidung im Harn einher. Vermehrte Zufuhr von Mg hatte keinen Einfluß auf die Überlebensdauer ganzkörperbestrahlter Ratten. Eine Beteiligung des Mg am Zustandekommen strahlenbedingter Stoffwechseländerungen ist nicht wahrscheinlich.

The distribution of magnesium in the male rat was studied after irradiation of the whole body with 1,000 R from a source of ⁶⁰Co. 4 days after irradiation, the Mg concentration was increased in the serum and in the liver. There was essentially no change in the concentration of Mg in the muscle. The Mg concentration in the serum started to rise on the third day after irradiation. As the level of serum Mg increased, the urinary Mg concentration decreased. The administration of increased amounts of Mg had no influence on the survival period of whole body-irradiated rats. It is unlikely that Mg is involved in the metabolic changes caused by irradiation.

Nach verschiedenen Untersuchern soll Mg an der biologischen Wirkung ionisierender Strahlen beteiligt sein: BACQ und Mitarbeiter (1) injizierten Fluoracetat und fanden eine verminderte Mortalität durch Röntgen-

strahlen, wenn die Bestrahlung 5 Stdn. nach der Injektion erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt hat Fluoracetat in den Zellen zu einer maximalen Anhäufung von Citrat geführt. Das angereicherte Citrat soll in der Zelle